

13.10.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

09/807470

REC'D 03 DEC 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年10月13日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第290711号

出願人

Applicant(s):

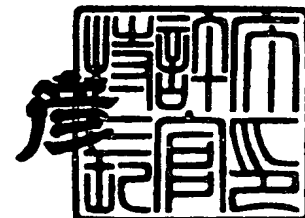
住友製薬株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月19日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3079347

【書類名】 特許願
 【整理番号】 132537
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C12N 15/12
 C07K 14/435
 C07K 16/18
 A61K 48/00

【発明の名称】 新規なタンパク質W A R - 1 及びその遺伝子

【請求項の数】 19

【発明者】

【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中 3 丁目 1 番 9 8 号 住友製薬株式会社内

【氏名】 東藤 直樹

【発明者】

【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中 3 丁目 1 番 9 8 号 住友製薬株式会社内

【氏名】 吉間 忠彦

【発明者】

【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中 3 丁目 1 番 9 8 号 住友製薬株式会社内

【氏名】 小宮 和雄

【発明者】

【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中 3 丁目 1 番 9 8 号 住友製薬株式会社内

【氏名】 東條 伸一郎

【発明者】

【住所又は居所】 静岡市瀬名 1 - 8 - 3 - 4 0 6

【氏名】 根本 清光

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所	大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
氏 名	住友製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代表者】 横塚 實亮

【代理人】

【識別番号】 100107629

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 敏夫

【電話番号】 06-466-5214

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056546

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710701

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規なタンパク質WAR-1及びその遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号: 2又は配列番号: 4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号: 2又は配列番号: 4に記載のアミノ酸配列のうち1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ癌

細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質

【請求項2】 以下の(c)又は(d)のDNA。

(c) 配列番号: 1又は配列番号: 3に記載の塩基配列からなるDNA

(d) 前記(c)のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項3】 配列番号: 1又は配列番号: 3に記載のDNAの全部又は一部をプローブに用いて染色体DNAライブラリーからクローニングされる、請求項2記載のDNA。

【請求項4】 プロモーター領域を含むことを特徴とする、請求項3記載のDNA。

【請求項5】 受託番号FERM P-17018、又は受託番号FERM P-17019で表示される微生物が有する、請求項1又は2記載のDNA。

【請求項6】 請求項1～5いずれか記載のDNAを発現することによって得られるタンパク質。

【請求項7】 請求項1～5いずれか記載のDNAを含有する組換え発現ベクター。

【請求項8】 請求項1～5いずれか記載のDNAを含有する組換えアデノウイルスベクター。

【請求項9】 請求項7又は8記載の組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換細胞。

【請求項10】 請求項1～5いずれか記載のDNAの全部又は一部よりなる1本鎖又は2本鎖DNAであって、かつ配列番号: 1又は配列番号: 3に記載

の塩基配列よりなるDNAの発現を特異的に検出し得る、ハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプライマー用のDNA。

【請求項 11】 以下の配列よりなる、請求項 10 記載のDNA。

5'側プライマー配列；5'-CACCTGGCTGGATCGCAGAATCGG-3'（配列番号：7）

3'側プライマー配列；5'-CTCTTTCCTCTTTGGCGGACAGTC-3'（配列番号：8）

【請求項 12】 請求項 10 又は 11 記載のDNAを、ハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプライマーとして用いることを特徴とする、配列番号：

1 又は配列番号：3 に記載の塩基配列よりなるDNAの発現の検出方法。

【請求項 13】 請求項 6 記載のタンパク質に結合する抗体。

【請求項 14】 請求項 13 記載の抗体を用いることを特徴とする、配列番号：2 又は配列番号：4 に記載のアミノ酸配列よりなるタンパク質の発現の検出方法。

【請求項 15】 請求項 12 又は 14 記載の検出方法よりなる、癌の診断方法。

【請求項 16】 請求項 1～5 いずれか記載のDNA、又は請求項 6 記載のタンパク質のいずれかを有効成分として含有する医薬。

【請求項 17】 配列番号：1 又は配列番号：3 に記載の塩基配列よりなるDNAの発現を増加させることを特徴とする、癌細胞増殖阻害剤。

【請求項 18】 請求項 1～5 いずれか記載のDNAを有効成分とする、癌細胞増殖阻害剤。

【請求項 19】 アデノウイルスベクターを用いることを特徴とする、請求項 18 記載の癌細胞増殖阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、WAR-1 と称される新規なタンパク質およびその遺伝子に関する。さらに詳しくは、癌細胞に対する増殖阻害活性を有する新規なタンパク質WAR-1、該WAR-1 をコードする遺伝子、前記WAR-1 に対する抗体、あるいはこれらの物質の、診断及び治療における用途などに関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、制癌剤の開発は、細胞の複製・遺伝子の転写や翻訳というセントラルドグマをターゲットにしたものをはじめ、シグナル伝達、分化、細胞周期、代謝、アポトーシス、テロメレース等に着目したものなど、様々な方面からの薬剤の開発が進められている。しかし、未だ決定的な薬剤が見出されたとは言えない状況にあり、新たなメカニズムに基づく制癌剤の創生が望まれている。

【0003】

ところで、シグナルペプチドを有するタンパク質のmRNAは、シグナル配列が合成された後に小胞体膜を透過し、その後小胞体内で翻訳の起こることが知られている。この小胞体膜輸送（小胞体膜透過）に関与する因子として、TRAMと称する因子の存在が知られている（Nature, 357, 47-52, 1992）。

通常、小胞体の膜を輸送されるタンパク質のmRNAは、細胞質へ輸送後リボソームと結合し、翻訳が開始され、膜透過に必要なシグナル配列がシグナル配列認識タンパク質に結合する。その後、複合体はシグナル配列認識タンパク質レセプターに結合し、小胞体膜上に固定される。次いで、シグナル配列認識タンパク質から解離した翻訳タンパク質とリボソーム複合体は、Sec61pと結合し、その際、小胞体膜上に存在するTRAMがシグナル配列を認識して、複合体に会合する。その後、翻訳されたタンパク質はSec61pを介して小胞体のルーメン側に輸送されると考えられている（Jungnickel et al., Cell, 82, 261-270, 1995）。以上のような小胞体膜輸送のメカニズムには例外もあり、ある種のシグナル配列を有するタンパク質の小胞体膜輸送には、TRAMは必ずしも必要ではないことも知られている（Voigt et al., J. Cell Biol., 134, 25-35, 1996）。

【0004】

このような小胞体膜輸送に関与するTRAMに対し、そのアミノ酸配列および塩基配列に相同性（ホモロジー）を有する因子が存在しているとの報告は、未だなされていない。また、それらの因子と前記癌との関連などについても、何ら報告はなされていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規なタンパク質WAR-1およびその遺伝子を提供することを目的とする。すなわち本発明は、構造的にはTRAMと高い相同性を有しており、機能的には癌細胞に対する増殖阻害活性を有する新規なタンパク質であるWAR-1、該WAR-1をコードする遺伝子、前記WAR-1に対する抗体、あるいはこれらの物質の、診断及び治療における用途を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、種々の新規なcDNAのクローニングを目的として、幼若ラットcDNAライブラリーからランダムにクローンの選択を行っていた。その過程において、シグナルペプチドを有するタンパク質の小胞体膜輸送（小胞体膜透過）に關与するTRAM（Nature, 357, 47-52, 1992）と高い相同性を有する新規なタンパク質をコードする遺伝子のクローニングに成功した。本発明者らはこの新規なタンパク質をWAR-1と命名した。該WAR-1は前記のように構造上、TRAMと相同性を有する因子であったが、機能については皆目不明であった。本発明者らはさらに検討を続けた結果、該WAR-1遺伝子を癌細胞内で発現させることにより癌細胞の増殖が阻害されること、すなわち本発明のWAR-1は癌細胞の増殖阻害活性を有するものであることが明らかとなった。従って本発明のWAR-1、又は該WAR-1をコードする遺伝子を有効成分として含有する医薬は、新規な抗癌剤として利用できるものと考えられる。ちなみに本発明のWAR-1は、悪性度の高い肉腫の癌の増殖をも抑制するものであることから、臨床上の有用性が期待される。

【0007】

さらに、WAR-1遺伝子の組織及び種々の癌細胞での発現を検討した結果、該WAR-1遺伝子は、肝臓、肺、リンパ系組織（脾臓、胸腺、白血球）などの組織においては通常発現が認められないが、癌化することによって特異的に発現してくることが明らかとなった。従って本発明のWAR-1遺伝子の部分断片、又は該WAR-1に対する抗体などが、これらの癌の診断に利用できるものと考え

えられる。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

【0008】

即ち本発明は、

(1) 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA、

(a) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列のうち1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質

(2) 以下の(c)又は(d)のDNA、

(c) 配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNA

(d) 前記(c)のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNA

(3) 配列番号：1又は配列番号：3に記載のDNAの全部又は一部をプローブに用いて染色体DNAライブラリーからクローニングされる、前記(2)記載のDNA、

(4) プロモーター領域を含むことを特徴とする、前記(3)記載のDNA、

(5) 受託番号FERM P-17018、又は受託番号FERM P-17019で表示される微生物が有する、前記(1)又は(2)記載のDNA、

(6) 前記(1)～(5)いずれか記載のDNAを発現することによって得られるタンパク質、

(7) 前記(1)～(5)いずれか記載のDNAを含有する組換え発現ベクター、

(8) 前記(1)～(5)いずれか記載のDNAを含有する組換えアデノウイルスベクター、

(9) 前記(7)又は(8)記載の組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換細胞、

(10) 前記(1)～(5)いずれか記載のDNAの全部又は一部よりなる1本鎖又は2本鎖DNAであって、かつ配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩

基配列よりなるDNAの発現を特異的に検出し得る、ハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプライマー用のDNA、

(11) 以下の配列よりなる、前記(10)記載のDNA、

5'側プライマー配列; 5'-CACCTGGCTGGATCGCAGAATCGG-3' (配列番号: 7)

3'側プライマー配列; 5'-CTCTTTCCTCTTTGGCGGACAGTC-3' (配列番号: 8)

(12) 前記(10)又は(11)記載のDNAを、ハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプライマーとして用いることを特徴とする、配列番号: 1 又は配列番号: 3 に記載の塩基配列よりなるDNAの発現の検出方法、

(13) 前記(6)記載のタンパク質に結合する抗体、

(14) 前記(13)記載の抗体を用いることを特徴とする、配列番号: 2 又は配列番号: 4 に記載のアミノ酸配列よりなるタンパク質の発現の検出方法、

(15) 前記(12)又は(14)記載の検出方法よりなる、癌の診断方法、

(16) 前記(1)～(5)いずれか記載のDNA、又は前記(6)記載のタンパク質のいずれかを有効成分として含有する医薬、

(17) 配列番号: 1 又は配列番号: 3 に記載の塩基配列よりなるDNAの発現を増加させることを特徴とする、癌細胞増殖阻害剤、

(18) 前記(1)～(5)いずれか記載のDNAを有効成分とする、癌細胞増殖阻害剤、ならびに

(19) アデノウイルスベクターを用いることを特徴とする、前記(18)記載の癌細胞増殖阻害剤、に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明のDNAのうちタンパク質をコードするものとしては、新規なタンパク質WAR-1をコードするDNA、又は該WAR-1をコードするDNAに類似のDNAであって、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNAであれば特に限定されない。具体的には、以下の1)～3)のDNAが例示される。

【0010】

1) 配列番号: 2 又は配列番号: 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質を

コードするDNA、あるいは配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNA。

2) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列のうち1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNA。

3) 配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNA。

以下、これらのDNAにつき順次説明する。

【0011】

1) WAR-1をコードするDNA

前記DNAのうち、「配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA」、「配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNA」とは、本発明のラットWAR-1をコードするDNAである。また「配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA」、「配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNA」とは、本発明のヒトWAR-1をコードするDNAである。このような、本発明のラットおよびヒトWAR-1をコードするDNAは、以下の如く寄託がなされている。

【0012】

すなわち、配列番号：1に記載のラットWAR-1をコードするDNAをベクターpBluescript IIに組み込んだprWAR-1を含有する大腸菌E. coli DH5α (prWAR-1)、及び、配列番号：3に記載のヒトWAR-1をコードするDNAをベクターpBluescript IIに組み込んだphWAR-1を含有する大腸菌E. coli DH5α (phWAR-1)は、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に、それぞれ受託番号FERM P-17018およびFERM P-17019で寄託されている（受託日：いずれも平成10年10月6日）。

【0013】

2) WAR-1の改変体又は変異体をコードするDNA

前記DNAのうち、「配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列のうち1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNA」とは、人為的に作製したいわゆる改変体（改変タンパク質）や、生体内に存在する変異体のうち、癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNAを指す。

【0014】

前記改変体をコードするDNAは、例えば制限酵素やヌクレアーゼ等を用いる方法、部位特異的変異導入方法 (W.Ito et al., Gene, 102, 67-70 (1991))、またはPCR法 (Molecular Cloning, 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) などによって、当業者ならば容易に作製することができる。

【0015】

ここで、「欠失、置換及び／又は付加」されるアミノ酸残基の数は、上記部位特異的変異導入法等の周知の方法により欠失、置換及び／又は付加できる程度の数を指す。

さらに、前記の如き遺伝子工学的手法を用いずに、細胞を変異原物質に曝すことによっても、当該改変体をコードするDNAを作製することが可能である。

【0016】

前記変異体をコードするDNAとは、生体内において自然に生じるものを指す。すなわち、塩基及びアミノ酸の欠失、置換または付加は、自然界に存在する、例えば癌のような場合や種差によっても生じることがあり、このような自然に生じた変異体をコードするDNAも、癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするものである限り、本発明のDNAの範疇に含まれる。

【0017】

前記改変等を施したDNAが癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするものであるか否かは、例えば以下の方法により測定することができる。

すなわち、前記改変を施したDNA等、本発明のDNAの候補となるDNAを発現ベクターに組み込み、これをヒト由来の癌細胞株に導入する。ここで癌細胞株としては、例えばT98Gなどのヒトグリア芽細胞腫を用いることが好ましい

。発現ベクターとしては、非ウイルスベクター、ウイルスベクターのいずれであっても、ヒト由来の癌細胞株において発現可能なベクターであれば特に限定されない（該発現ベクターについては後に詳述する）。該組換え発現ベクターを癌細胞株に導入し、培養した後に、細胞数や細胞の形態変化を観察する。このとき、外来DNAを組み込んでいない発現ベクターを用いて全く同じ操作を行うことにより調製された細胞をコントロールとし、比較することが重要である。コントロール細胞と比較して細胞数の減少、あるいは細胞の形態変化が観察された場合は、前記候補DNAは癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするものであると判断することができる。

【0018】

さらに、前記の遺伝子導入細胞において³Hで標識されたチミジンの取り込み能の低下を測定すること（Nagase et al., Int. J. Cancer, 65, 620-626, 1996）、あるいは癌細胞を接種したヌードマウスに対して前記候補DNAを有するアデノウイルスを感染させた後に、腫瘍形成能の低下を測定すること（Cheney et al., Cancer Res., 58, 2331-2334, 1998）などによっても、癌細胞の増殖阻害活性を有するか否かを測定することができる。

【0019】

3) WAR-1 DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

前記DNAのうち、「配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNA」とは、例えば、

A) 脊椎動物全てのWAR-1をコードするcDNA、又は該WAR-1の部分タンパク質をコードするcDNA、

B) 脊椎動物全てのWAR-1をコードする染色体DNA、

のような、配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるラット又はヒトWAR-1 DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAのうち、癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするものを指す。

【0020】

ここで、「ストリンジェント条件下でハイブリダイズするDNA」とは、例え

ばハイブリダイゼーション緩衝液として0.1% SDS、50%ホルムアミド、5xSSC、1xDenhardt試薬、250 μ g/mlサケ精子DNAの組成の溶液を用いて、42℃で一晩ハイブリダイズした後、2xSSCを用いて室温で1時間洗浄、2xSSC、0.1% SDSを用いて室温で30分間、その後0.1xSSC、0.1% SDSを用いて50~65℃で30分洗浄するような条件下でハイブリダイズするようなDNAを指す。

【0021】

前記A)のDNAは、例えば配列番号：1又は配列番号：3に記載のDNAの全部又は一部をプローブに用いたハイブリダイゼーション、あるいは配列番号：1又は配列番号：3に記載のDNAの一部をプライマーに用いたPCR等によりクローニングされるものであるが、具体的なcDNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、ポジティブコロニーの選択、塩基配列の決定等の操作はいずれも公知であり、例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等を参照にして行うことができる。以下に、具体的なクローニング方法の一例について記載する。

【0022】

前記A)のDNAは、例えば以下の工程a)~b)を含む方法により単離することができる。

a) 所望の種由来の組織あるいは培養細胞株より全RNAを調製し、ポリ(A)RNAを精製し、cDNAライブラリーを作製する工程。

b) 配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列の全部又は一部よりなるプローブを調製し、該プローブを用いて前記a)で作製したcDNAライブラリーとのハイブリダイゼーション反応を行うことにより目的のDNAを単離する工程。

【0023】

ここで、前記a)工程における全RNAの調製は、常法に従って行えば良いが、例えばSDS、NP-40、Triton-X100等の界面活性剤もしくはフェノール存在下で細胞を処理することにより、細胞を分解する方法が挙げられる。また、ホモゲナイザー等の物理的方法によって細胞を破碎し、グアニジンチ

オシアネートで細胞を処理した後、塩化セシウム密度勾配遠心によって全RNAを沈澱化させる、または、グアニジンチオシアネート存在下で細胞を処理した後、酸性条件下フェノール処理（酸性グアニジンチオシアン酸-フェノールクロロホルム法）することによって全RNAを調製する方法も挙げられる。次に上記方法のいずれかによって得られた細胞の全RNAからポリ(A)RNA(mRNA)を精製するには、オリゴ(dT)-セルロース、ポリUを結合したポリU-セファロースなどのアフィニティーカラムを用いるか、mRNAの長さが判明している場合もしくは更にmRNAの長さに基づいて分画したい場合には、ショ糖密度勾配遠心法、アガロースゲル電気泳動、カラムによるゲルろ過法等を用いて調製することができる。上記の如くして得られたmRNAよりcDNAライブラリーを作製する方法としては、例えばmRNAを鋳型として一本鎖cDNAを合成し、次いで二本鎖cDNAを合成して適当なベクターに組み込んで宿主大腸菌に組換えベクターを導入する方法が挙げられる。ベクターとしては、プラスミド及び入ファージベクターが多用される。以下、該cDNAライブラリーの作製法につき記述する。

【0024】

まず、mRNAを鋳型とし、オリゴ(dT)プライマーもしくは末端に適当な配列を付加したオリゴ(dT)プライマーまたは6塩基からなるランダムプライマーを用いて、逆転写酵素（トリ骨髄芽球性白血病ウイルス；AMV由来または、マウス白血病ウイルス；Mo-MLV由来）によりmRNAと相補的な一本鎖cDNAを合成する。次いで、アルカリ処理を行うことによってmRNAを分解した後、一本鎖cDNAを鋳型として逆転写酵素もしくはDNAポリメラーゼにより二本鎖cDNAを合成する。ここで二本鎖cDNAの合成は、直接RNAse H及び大腸菌DNAポリメラーゼIを働かせることによっても行い得る。その後、いずれの方法においても、S1ヌクレアーゼ、T4 DNAポリメラーゼもしくは大腸菌DNAポリメラーゼI（Klenow断片）等の酵素のいずれかを用いることによって合成された二本鎖cDNAの両末端を平滑化する。得られた平滑末端化された二本鎖cDNAは適当なベクターに挿入する為に、リンカーやアダプター等の化学合成DNAまたはdG, dC鎖をデオキシターミナルトラン

スフェラーゼによって付加し、末端修飾を行う。次に、適当なベクターにこの二本鎖 cDNA を組み込んだ後、大腸菌を形質転換して cDNA ライブラリーを作製する。ここで、プラスミドベクターに二本鎖 cDNA を組み込み宿主大腸菌を形質転換する場合は、この DNA を取り込むことの出来るコンピテント細胞の対数増殖期における細胞を集め、H a n a h a n が詳細に報告している方法 (J. Mol. Biol., 166, 557 (1983)) に準じて形質転換を行えば良い。また、ファージベクターに二本鎖 cDNA を組み込み宿主大腸菌を形質転換させる場合は、T4 DNA リガーゼによって連結された DNA をインビトロパッケージングによりファージ粒子内に導入し、これを宿主大腸菌に感染させることによって形質転換を行うことができる。

【0025】

次に工程 b) であるが、配列番号：1 又は配列番号：3 に記載の塩基配列の全部又は一部よりなるプローブを調製し、該プローブと前記で作製した cDNA ライブラリーとのハイブリダイゼーション反応を行うことにより目的の DNA を単離することができる。ここでプローブは、例えば配列番号：1 又は配列番号：3 に記載の塩基配列の適当な部分断片を DNA 合成機により合成するか、あるいは PCR により該部分断片を増幅し、その後ニックトランスレーション法又はランダムプライムラベリング法等の常法により該 DNA 断片を ^{32}P で標識することにより作製することができる。ハイブリダイゼーション反応としては、前述の条件が挙げられる。

【0026】

前記 B) の DNA、すなわち WAR-1 をコードする染色体 DNA は、例えば配列番号：1 又は配列番号：3 に記載の DNA の全部又は一部、あるいは前記 A) に記載の DNA の全部又は一部などをプローブに用い、所望の種由来の組織、あるいは培養細胞株から調製された染色体 DNA ライブラリーとのハイブリダイゼーションを行うことにより、クローニングすることができる。

【0027】

ここで、染色体 DNA の調製及び染色体 DNA ライブラリーの作製は、常法に従って行えば良い。すなわち、所望の種由来の組織もしくは培養細胞株を SDS

存在下で処理し、RNase及びプロテイナーゼKで不必要なRNA及びタンパク質を分解する。その後、フェノール処理を行い、エタノール沈澱もしくは透析によって染色体DNAを精製すれば良い。得られた染色体DNAを適当な制限酵素を用いて部分的に切断するか、クローニングする断片の長さが判明している場合には、必要な制限酵素によって完全分解させる。クローニング用のベクターに外来遺伝子を導入する際に許容されるDNAの長さに応じて染色体DNA切断断片を分画するためには、ショ糖密度勾配遠心、アガロースゲル電気泳動、カラムによるゲルろ過法等を用いることができる。得られた切断断片をλファージベクターもしくはコスミドベクターに導入し、インビトロパッケージング後、ファージもしくはコスミドを用いた染色体DNAライブラリーを作製する。

【0028】

WAR-1をコードする染色体DNAのクローニングを行うためには、前記のファージもしくはコスミドライブラリーを大腸菌に感染させ、WAR-1のcDNAの全部又は一部をニックトランスレーション法もしくはランダムプライムラベリング法などで³²Pで標識したプローブを用い、常法(Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等を参照)に従いブランクもしくはコロニー・ハイブリダイゼーションなどを行えば良い。

なお、以上のような染色体DNAには、遺伝子の発現調節に関与する、いわゆるプロモーター領域が含まれており、該プロモーター領域を含有する染色体DNAは、上記の手法により容易に取得することができる。

【0029】

上記した本発明の種々のDNAを発現ベクターに組み込むことにより、本発明のDNAを含有する組換え発現ベクターを作製することができる。さらに、該組換え発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明の形質転換細胞を作製することができる。

【0030】

該発現ベクターは、非ウイルスベクター、ウイルスベクターのいずれかを問わず、本発明のDNAが挿入でき、該DNAがコードするタンパク質の発現が可能なベクターであれば特に限定されない。ここで非ウイルスベクターとは、一般的

な哺乳動物細胞発現プラスミドベクターであり、例えば pBK-CMV、pCAGGS、pcDNA3.1、pZeoS_Vなどが挙げられる。本発明のDNAを組み込んだ非ウイルス性発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、リン酸-カルシウム共沈法、リポソームを用いてDNA分子を導入する方法（リポソーム法、リポフェクション法、リポフェクトアミン法）、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガンで坦体とともにDNA分子を細胞に移入する方法等が挙げられる。また宿主細胞としては、例えばHeLa、COS1、A549、293細胞などが挙げられる。

【0031】

後者のウイルスベクターとしては、アデノウイルス及びレトロウイルス等のウイルスベクターが代表的なものである。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス（HIV）等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに当該タンパク質をコードする遺伝子を導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。その際の宿主細胞としては、例えば293、A549、HeLa細胞などが挙げられる。

【0032】

以上のような本発明の形質転換細胞を好適な条件下で培養し続けることにより、本発明のDNAからタンパク質を発現、生産することが可能である。ここで「好適な条件下」とは、その宿主細胞に適した培養用培地により、37℃、5%CO₂存在下で培養するような条件を指す。

【0033】

このような好適な条件下で培養した形質転換細胞より、前記本発明のタンパク質を単離し、精製することが可能である。ここで、本発明のタンパク質の粗抽出液を得る方法、また、該粗抽出液から本発明のタンパク質を精製する方法としては、例えば日本生化学会編、新生化学実験講座1、タンパク質I-分離・精製・性質-、1990に記載された方法を用いて行うことが可能である。

以上のようにして得られた本発明のタンパク質の具体例としては、例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列よりなるラットWAR-1、又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列よりなるヒトWAR-1が挙げられる。

【0034】

前記本発明のタンパク質の癌細胞増殖阻害活性は、以下のようにして測定することができる。すなわち、T98Gなどの癌細胞の培養液中に本発明のタンパク質を添加する。その際、本発明のタンパク質を、あらかじめリボソームに封入したり、リピッドを結合させることにより、細胞膜への透過性を増しておく。また、タンパクのC末端に小胞体保持配列であるLys-Asp-Glu-Leu (KDEL) を付加したりすることにより、細胞質に取り込まれたタンパク質を小胞体に輸送できるようにする。このような処理を施した本発明のタンパク質を培養液に添加後、数日間培養し、癌細胞の細胞数や細胞の形態変換を観察することにより、本発明のタンパク質の癌細胞増殖阻害活性を測定することができる。また、³Hで標識されたチミジンの取り込み能の低下を測定すること (Nagase et al., Int. J. Cancer, 65, 620-626, 1996) によっても、癌細胞の増殖阻害活性を測定することができる。

【0035】

本発明のタンパク質をコードするDNAの全部又は一部よりなる1本鎖又は2本鎖DNAを、ハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプライマーに用いて、生体組織、又は培養細胞株などにおけるWAR-1 DNAの発現を特異的に検出することが可能である。該1本鎖又は2本鎖DNAとしては、WAR-1 DNAの転写産物であるWAR-1のmRNAを選択的に検出することのできる1本鎖又は2本鎖DNAであれば、特に限定されない。

【0036】

具体的な検出方法としては、以下の1)、2)の2つの手法が挙げられる。

1) WAR-1のmRNAを特異的に検出することのできる2本の1本鎖DNA (正鎖及び逆鎖) をPCRプライマーとして用い、被験用の組織又は培養細胞株より得られた全RNAもしくはポリ (A) RNAを基質として、PCRにより解析を行う手法。

2) WAR-1のmRNAを特異的に検出することのできる1本鎖又は2本鎖DNAを放射標識し、これをプローブとして、被験用の組織又は培養細胞株より得られた全RNAもしくはポリ(A)RNAに対してノーザンブロット解析を行う手法。

【0037】

以上の1)及び2)の検出法は、例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等の基本書に基づき行うことができる。

以下に具体例を示す。

1)のPCRの具体的な手法としては、例えば以下の方法が挙げられる。まず、WAR-1のmRNAを特異的に検出することのできるPCRプライマーを常法により合成する。次に、被験用の組織又は培養細胞株より、前述の方法にて全RNA又はポリ(A)RNAを調製し、これを鋳型として、MMTV-RT等の逆転写酵素により1本鎖DNAを調製する。その後、先のPCRプライマーを添加し、常法によりPCR反応を行う。PCR反応の条件としては、例えば95℃1分、60℃1分、72℃2分を35サイクル行った後に、72℃で10分加熱するような条件が挙げられる。このPCR反応物を適当な濃度のアガロースゲルにて電気泳動することにより、WAR-1 mRNAの発現の有無を検出することができる。その他、*in situ* PCR法(Fernandez et al., Mol. Carcinog, 20, 317-326, 1997)を用いることによっても、WAR-1 mRNAの検出を行うことが可能である。

【0038】

2)のノーザンブロット解析の具体的な手法としては、例えば以下の方法が挙げられる。まず、WAR-1のmRNAを特異的に検出することのできる1本鎖又は2本鎖DNAを放射標識し、プローブを作製する。2本鎖DNAの場合は、例えば前記1)の手法により調製されたPCR反応物を、ニックトランスレーション法又はランダムプライムラベリング法などで³²P標識することにより作製される。次に、被験用の組織又は培養細胞株より、前記と同様の手法により全RNA又はポリ(A)RNAを調製し、常法によりホルムアルデヒドゲル電気泳動及びナイロンメンブレンへのブロッティングを行う。このメンブレンと、先のプロ

ープとのハイブリダイゼーションを行うことにより、WAR-1 mRNAの発現の有無を検出することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、2本鎖DNAをプローブとして用いる場合、例えば45% (v/v) ホルムアミド、5×SSPE、2×デンハルト溶液、0.5% SDS、20 μg/ml サケ精子DNAの条件で42℃、16-24時間ハイブリダイズさせた後に、2×SSPE、0.5% SDS中で室温、10分間2-3回洗浄し、更に65℃、2×SSPE、0.5% SDS中で20分間2-3回洗浄するような条件が挙げられる。

【0039】

前記検出方法において使用される1本鎖又は2本鎖DNAとしては、具体的には以下のものが挙げられる。

すなわち図1に、ヒトWAR-1 (hWAR-1) 及びラットWAR-1 (rWAR-1) の塩基配列を、小胞体膜輸送に関与する公知の因子であるヒトTRAM (hTRAM) の塩基配列と比較した結果を示しているが(図中、黒枠が相同性を有する部分)、ヒトWAR-1に特異的なプローブ又はプライマー部分の選択に関しては、ヒトTRAMとヒトWAR-1の相同性が低い領域を選択することが重要である。この際、両者のcDNAから増幅されるDNA断片を区別できるようにするため、一方の配列に一部塩基配列の欠失のある領域を増幅することが好ましい。また、両者のcDNAを特異的に認識するプライマーとして、プライマー配列全領域で相同性がないことが好ましいが、特に3'末端近傍の配列が大きく異なる方が、増幅したくないcDNAに対して伸長反応が進みにくくなるため、特異性が向上すると考えられる。さらに、3'末端の塩基が異なるよう

に設定すればより特異的な増幅に効果的である。また、National Biosciences社のソフトウェアOligo等のプログラムによるプライマー解析も利用し得る。

以上のようにして選択した部分を基にして、常法により前記1)のプローブ又は前記2)のプライマーを作製することができる。

【0040】

一例としては、以下の配列よりなる1本鎖DNA、又はこの1本鎖DNAをプライマーとして前記PCR反応を行うことにより増幅される2本鎖DNAなどが

挙げられる。

【0041】

5'側プライマー配列；5'-CACCTGGCTGGATCGCAGAATCGG-3'（配列番号：7）

3'側プライマー配列；5'-CTCTTTCCTCTTTGGCGGACAGTC-3'（配列番号：8）

【0042】

ここで配列番号：7は、図1のhWAR-1DNAの第823位～第846位の正鎖部分に相当し、配列番号：8は、図1のhWAR-1DNAの第1075位～第1098位の逆鎖部分に相当する。

以上のような1本鎖DNA又は2本鎖DNAを前記検出方法1)のPCRプライマー、又は前記検出方法2)のハイブリダイゼーションプローブとして用いることにより、WAR-1のDNAの特異的な発現を検出することができる。詳しくは実施例4を参照されたい。なお、このようなプライマーおよびプローブは、天然のWAR-1由来の配列のみに限定されず、WAR-1DNAの転写産物であるWAR-1のmRNAを特異的に検出することのできるDNAであれば、置換、欠失、付加などの修飾を施したものであっても良い。

【0043】

以上のようなWAR-1DNAの発現検出方法の具体的な用途としては、疾患の診断目的の他、*in situ*ハイブリダイゼーションのような研究目的にも応用される。

「課題を解決する手段」において記述したように、WAR-1遺伝子は、肝臓、肺、リンパ系組織（脾臓、胸腺、白血球）などの組織においては通常発現が認められないが、これらの組織が癌化することによって、特異的に発現してくることが明らかとなった。従って、前記のようなWAR-1特異的なPCRプライマー又はハイブリダイゼーションプローブを用い、患者由来の癌組織又は癌細胞に対して前記の如きWAR-1mRNAの検出を行うことにより、癌の診断を行うことができる。

【0044】

本発明において抗体とは、前記した本発明のタンパク質に結合する抗体である。該抗体は、例えば、Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H, D.ら編、Cold

Spring Harbor Laboratory Press(1989)、新細胞工学実験プロトコール、秀潤社(1993)などに記載の方法により容易に作製される。すなわち、本発明のタンパク質又はその一部を用いて常法により適宜動物を免疫することにより、本発明のタンパク質に結合する抗体を作製することができる。

【0045】

ここで、免疫抗原として使用される本発明のタンパク質は、前記したように、本発明のDNAを含む組換え発現ベクターを大腸菌もしくは培養細胞株に導入し、これらの形質転換体より当該ポリペプチドを大量に調製、精製することにより、得ることができる。また、本発明のタンパク質のアミノ酸配列の一部よりなるペプチドを常法により合成し、BSAやKLH等にコンジュゲーションを行い、これを免疫抗原とすることも可能である。

免疫感作する種としては、ウサギ、マウス、ラット、ニワトリ、ウシ、ロバ、ヒツジ、ウマ等何れでも良く、また、当該本発明のタンパク質を認識する抗体であれば、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体の何れでも良い。

【0046】

該抗体は、WAR-1タンパク質の発現の検出、又は該タンパク質の分離などに使用される。具体的には、アフィニティークロマトグラフィー、cDNAライブラリーのスクリーニング、免疫学的診断などに利用することができる。

【0047】

本発明の抗体を用いることにより、癌の免疫学的診断を行うことができる。すなわち、本発明の抗体を用いることにより、WAR-1を産生する癌組織または細胞を検出することが可能となり、癌の診断に適用することが可能となる。具体的な検出法としては、蛍光抗体法、ウェスタン・ブロット法、免疫沈降法、免疫組織染色法が挙げられる。このうち、蛍光抗体法についての具体的な手順は、Samoszuk et al., Am. J. Clin. Pathol., 109, 205-210, 1998やBernardini et al., Tumori., 83, 673-678, 1997に記載された方法に準じて行えばよい。

【0048】

本発明のDNA又は本発明のタンパク質は、医薬の有効成分とすることができる。前記したように本発明のタンパク質は、癌細胞に対する増殖阻害活性を有し

ている。従って本発明のDNAを医薬の有効成分として癌患者に投与し、体内で発現させる遺伝子治療剤として使用するか、又は本発明のタンパク質を医薬の有効成分として癌患者に投与することにより、癌細胞の増殖を阻害し、癌の治療を行うことができる。なお、本発明のDNA又はタンパク質を有効成分として用いる場合のみならず、生体内のWAR-1遺伝子又はタンパク質の発現を誘導するような因子又は化合物を用いた場合にも同様に、前記癌細胞の増殖阻害効果が認められる。従って、このようなWAR-1遺伝子の発現を誘導するような因子、

化合物、又はWAR-1タンパク質の発現を誘導するような因子、化合物を有効成分とする癌細胞増殖阻害剤もまた、本発明の範疇に含まれる。

【0049】

本発明のタンパク質を有効成分とする治療剤は、アジュバントとともに投与したり、粒子状の剤形にして投与することができる。剤形として、より具体的には、リポソーム製剤、直径数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤等の剤形にすることができる。投与方法としては徐放性のミニペレット製剤などが挙げられる。本発明のタンパク質の様に、小胞体に存在すると予想されるタンパク質を本タンパク質が機能する小胞体を選択的に輸送するためには、小胞体に保持されることが知られるタンパク質のC末端に存在するLys-Asp-Glu-Leu (KDEL) 配列を本タンパク質のC末端に付加することが可能である。C末端にKDEL配列を有するタンパク質は、ゴルジ体及び小胞体に存在するレセプタータンパク質に結合し、ゴルジ体から小胞体に逆輸送することが知られている (Majoul et al., J. Cell Biol., 133, 777-789, 1996)。

更に、特定の糖ペプチド鎖や糖鎖をタンパク質に付加することやビオチンを結合させることによって本タンパク質に組織移行選択性をもたらすことが可能である。具体的には、肝細胞に特異的にタンパク質を蓄積させるために、asialoglycoprotein (Merwin et al., Bioconjug Chem., 5, 612-620, 1994) や galactose (Chen et al., Hum Gene Ther., 5, 429-435, 1994) でポリペプチドを修飾することが可能である。また、特定の組織や細胞で発現するタンパク質と結合するタンパク質をビオチン化し、アビジンとビオチン化した本タンパク質とで複合体を形成させることによって組織移行性を高めることが可能で

ある (Saito et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 10227-10231, 1995, P
ardridge et al., Pharm. Res., 11, 738-746, 1994)。

【0050】

投与量は、癌細胞の特性、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常 0.001mg/Kg/回～1000mg/Kg/回であり、これを初期時には連日投与、その後、数日ないし数ヶ月に1回投与するのが好ましい。投与形態としては、剤形に応じて経口、動脈注射、静脈注射、筋肉注射、癌組織に対する局所注射により投与することが可能である。

【0051】

本発明のDNAを有効成分とする遺伝子治療剤は、細胞内でWAR-1タンパク質を大量に産生させ、癌細胞内においては癌細胞の増殖を阻害することができる。

本発明のDNAを有効成分とする遺伝子治療剤を癌細胞に導入する場合、その投与形態としては非ウイルスベクターを用いた場合と、ウイルスベクターを用いた場合の二つに大別される。

より詳細に説明すると、本発明のDNAを細胞内で作用させる手段として、以下の方法が挙げられる。

【0052】

A. 非ウイルスベクターを用いる場合

遺伝子発現ベクターに本発明のDNAを導入し、リン酸-カルシウム共沈法、リポソームを用いてDNA分子を導入する方法（リポソーム法、リポフェクティン法、リポフェクトアミン法）、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガンで担体とともにDNA分子を細胞に移入する方法等の何れかの方法により組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることが可能である。ここで用いられる発現ベクターとしては、例えばpBK-CMV、pCAGGS、pcDNA3.1、pZeoSV等が挙げられる。

【0053】

B. ウイルスベクターを用いる場合

ウイルスベクターとしては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイ

ルスベクターを用いた方法が代表的なものである。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス（HIV）等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに本発明のDNAを導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。

前記ウイルスベクターの内、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、従って、アデノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

【0054】

これらの方法の何れかを用いることによって、WAR-1をコードする遺伝子を癌細胞内に導入することが可能である。また、非ウイルスベクターによる遺伝子治療では、局所投与や組織移行性を高めた剤形との組み合わせ等によって疾患部位の近傍に遺伝子を導くことが好ましいが、ウイルスベクターによる遺伝子治療では、必ずしも局所投与をする必要はなく、静脈内投与も可能である。投与形態としては、製剤形態（例えば液剤など）をとり得るが、必要に応じて慣用の担体等を加えても良い。また、疾患部位の近傍に遺伝子を導入し易くするために、徐放性の製剤とすることも可能である。

【0055】

本発明の遺伝子治療剤を実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入する*in vivo*法、及びヒトからある種の細胞を取り出して体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す*ex vivo*法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36（1）、23-48（1994）、実験医学増刊、12（15）、（1994））。本発明では、*in vivo*法が好ましい。

【0056】

製剤中のDNAの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調節することができるが、通常、本発明のDNAとして0.0001-100mg、好ましくは0.001-10mgであり、これを数日ないし数ヶ月に1回投与

するのが好ましい。

【0057】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

【0058】

実施例1

ラットcDNAライブラリーの作製

種々の新規なcDNAのクローニングを目的として、以下の手法により幼若ラットのcDNAライブラリーを作製した。

まず生後12日令の幼若ラットの組織を摘出し、常法によりグアニジンチオシアン酸溶液を加えてホモゲナイズした後、塩化セシウム密度勾配遠心法により2mgの全RNAを調製した。

この全RNAをオリゴ(dT)セルロースカラム(ファルマシア社製)にかけることにより、ポリ(A)付加配列を有する103 μ gのmRNAを精製した。このうち16 μ gのmRNAをオリゴ(dT)プライマー及びランダムプライマーを用いて、逆転写酵素によって一本鎖相補DNAを合成した。次いでRNaseH及びE. coli DNAポリメラーゼIを反応させることにより、二本鎖cDNAを合成した。得られた二本鎖cDNAの末端を平滑化するためにT4 DNAポリメラーゼで処理し、両末端にEcoRIアダプターを付加した。最終的なcDNA量は、オリゴ(dT)プライマー及びランダムプライマーを用いた場合、各々2 μ gと1.3 μ gであった。その内の一部を λ ファージベクターである λ gt10のEcoRI切断部位に挿入後、インビトロパッケージングキット(ストラタジーン社製)により λ ファージ粒子内に導入し、これを大腸菌C600^{hfl}(ストラタジーン社製)に感染させることにより、目的とする幼若ラットcDNAライブラリーを調製した。plaque forming units (pfu) は、先にオリゴ(dT)プライマー及びランダムプライマーを用いて合成されたcDNA 1 μ g当たり、各々 8.8×10^7 pfu及び 2.5×10^7 pfuであった。

【0059】

実施例2

rWAR-1をコードするcDNA塩基配列の決定

実施例1で得られたcDNAライブラリーよりランダムにクローンを選別し、通常のプレートライセート法によりλファージDNAを回収し、制限酵素EcoRIで切断後、挿入cDNA部分をM13ファージベクターにサブクローニングした。そのうちのひとつについて挿入cDNA部分の塩基配列を決定した結果、クローニングされたcDNAの長さは約2.2Kbであり、約1Kbに亘りオープン・リーディング・フレームが存在していることが明らかとなった。1.8KbからなるEcoRI断片をプローブに用いて常法によりノーザン解析を行った結果、このcDNAの対応mRNAのサイズは2.4Kb程度と推定されたため、poly(A)配列の長さを加味すると、ほぼ全長のcDNAが得られたと予想された。得られたクローンをクローン12と命名した。クローン12の有するcDNAの塩基配列をGenBankデータベースで検索したところ、ヒト由来の小胞体膜輸送関連タンパク質であるTRAM(GenBank Accession No. X63679)と塩基配列上59.7%、アミノ酸配列上57.0%の相同性が認められたが(表1)、完全に一致する配列は見出されなかったことから、クローン12の有するcDNAは新規なcDNAであることが明らかとなった。この新規なcDNAによりコードされるタンパク質を、ラットWAR-1(rWAR-1)と命名した。rWAR-1の塩基配列及び推定上のアミノ酸配列を、配列番号:1及び2に示した。また、公知のヒトTRAM(hTRAM)の塩基配列及びアミノ酸配列を、配列番号:5および6に示した。

【0060】

【表1】

ヒトWAR-1、ヒトTRAMおよびラットWAR-1の相同性 (%)

		ラットWAR-1	ヒトTRAM
ヒトWAR-1	塩基配列 (アミノ酸配列)	72.4 (72.7)	76.3 (70.7)
ヒトTRAM	塩基配列 (アミノ酸配列)	59.7 (57.0)	

【0061】

なお、上記 rWAR-1 の cDNA 断片をベクター pBluescript II に組み込んだプラスミド、p rWAR-1 を含有する大腸菌 E. coli DH5 α (p rWAR-1) は、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている（微生物の表示：E. coli DH5 α (p rWAR-1)；受領日：平成10年10月6日；受託番号：FERM P-17018）。

【0062】

実施例3

hWAR-1 をコードする cDNA のクローニングと塩基配列の決定

rWAR-1 のオープン・リーディング・フレームに相当する 0.8 Kb からなる EcoRI-XhoI DNA 断片をプローブに用いて、常法により、ヒト cDNA ライブラリー（クロンテック社製）からヒト型 WAR-1 の cDNA を有するクローンのスクリーニングを行った。その結果、 1×10^6 pfu のヒト cDNA ライブラリーから 1 クローンが単離された。塩基配列を決定した結果、実施例2で得られた rWAR-1 と塩基配列上 72.4%、アミノ酸配列上 72.7% の相同性を示したため、これをヒト型 WAR-1 (hWAR-1) をコードする cDNA であると結論した（表1）。決定された塩基配列及び推定上のアミノ酸配列を、配列番号：3 および 4 に示す。この hWAR-1 は、先の hTRAM と塩基配列上 76.3%、アミノ酸配列上 70.7% の相同性を示した（表

1)。

【0063】

なお、上記hWAR-1のcDNA断片をベクターpBluescript IIに組み込んだプラスミド、phWAR-1を含有する大腸菌E. coli DH5α (phWAR-1)は、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている（微生物の表示：E. coli DH5α (phWAR-1)；受領日：平成10年10月6日；受託番号：FERM P-17019）。

【0064】

これらhWAR-1、rWAR-1及びhTRAMをコードするcDNAの塩基配列を比較した結果を、図1に示す。また、hWAR-1、rWAR-1及びhTRAMのアミノ酸配列を比較した結果を、図2に示す。

【0065】

実施例4

各種ヒト癌細胞樹立株におけるhWAR-1をコードする遺伝子の発現の検討

hWAR-1とhTRAMをコードする遺伝子のヒト各種癌細胞での発現を検討する目的で、hWAR-1 mRNAとhTRAM mRNAを各々特異的に増幅するプライマーを設定し、以下の条件にてRT-PCRを行った。

hWAR-1 mRNAを増幅するための5'側のプライマーとして、図1のhWAR-1の塩基配列の第823位～第846位（配列番号：7）の部分を用い、3'側のプライマーとして、第1075位～第1098位（配列番号：8）の部分を用いた。また、hTRAM mRNAを増幅するための5'側のプライマーとして、図1のhTRAMの塩基配列の第823位～第846位（配列番号：9）の部分を用い、3'側のプライマーとして、第1084位～第1107位（配列番号：10）の部分を用いた。

【0066】

ヒト由来の癌細胞株として、子宮頸部癌細胞株HeLa、肺癌細胞株A549、膀胱癌細胞株T24、大腸癌細胞株SW480、グリア芽細胞腫株T98G、肝癌細胞株HepG2、ウィルムス腫瘍：腎癌細胞株G401、バーキットリン

パ腫：Bリンパ腫細胞株Daudi、及びTリンパ腫細胞株MOLT4、Jurkatを用いた。これらの細胞株のうち、理研ジーンバンクより入手されるT24細胞以外のものは全て、大日本製薬より入手し得る。

【0067】

RT-PCRの反応は以下のように行った。

まず、上記各癌細胞株よりニッポンジーン社の全RNA精製キット (ISOG EN) を用いて、全RNAを調製した。この全RNA $4\mu\text{g}$ ($9.5\mu\text{l}$) に
 対し、 100mM DTT $2.0\mu\text{l}$ 、 $5\times$ First Strand Buffer (Gibco BRL社) $4.0\mu\text{l}$ 、 $40\text{U}/\mu\text{l}$ RNasein (Promega社) $0.5\mu\text{l}$ 、 10mM dNTP $2.0\mu\text{l}$ 、 $0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pd(N)₆プライマー $1.0\mu\text{l}$ 、 $200\text{U}/\mu\text{l}$ MMTV-RT (Gibco BRL社) $1.0\mu\text{l}$ を加え、 37°C で45分加温し、 95°C で5分間加熱することによって酵素を失活させた。次に、反応液から $16\mu\text{l}$ を分取し、 H_2O を $24\mu\text{l}$ 加えた。その内、 $2.0\mu\text{l}$ の反応液に $10\times$ PCR Buffer (Perkin Elmer社) $2.5\mu\text{l}$ 、 2.0mM dNTP $2.5\mu\text{l}$ 、 $25\mu\text{M}$ 各5'プライマー、 $25\mu\text{M}$ 各3'プライマー、 H_2O $16.875\mu\text{l}$ 、及び $5\text{U}/\mu\text{l}$ AmpliTaq Gold (Perkin Elmer社) $0.125\mu\text{l}$ を加え、 95°C で9分加熱後、 95°C 1分、 60°C 1分、 72°C 2分の反応を35回行い、最後に 72°C で10分間加熱した後、反応液 $3\mu\text{l}$ を2%アガロースゲル電気泳動に供した。結果を図3に示す。

hTRAMは全ての癌細胞で発現していることが確認されたが、hWAR-1では、Jurkat等でhTRAMよりも幾分発現の低いことが示され、hTRAM遺伝子の発現様式と異なることが示された (図3)。

【0068】

実施例5

ヒト正常組織におけるhWAR-1をコードする遺伝子の発現の検討

hWAR-1遺伝子とhTRAM遺伝子の組織での発現性を検討するために、以下の実験を行った。

まず、前記したhWAR-1特異的なプライマー配列 (配列番号：7及び8)

を用いて実施例4と同様のRT-PCRを行うことにより、hWAR-1遺伝子の目的断片を増幅し、これをpT7Blue (R) T vector (Novagen社)にクローニングした。同様に、hTRAM特異的なプライマー配列(配列番号: 9及び10)を用いたRT-PCRによりTRAM遺伝子の目的断片を増幅し、クローニングを行った。その後、これらのプラスミドを鋳型としてプライマー配列(配列番号: 7及び8)を用いてRT-PCRを行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて増幅DNA断片を回収した。

【0069】

次に、得られたDNA断片をマルチプライムラベル法により³²Pで標識してプローブを調製し、Clontech社より購入したMTNブロットフィルター(human MTN blot I及びhuman MTN blot II)に対して常法によりハイブリダイゼーションを行った。また、コントロールプローブとしてClontech社より購入したβ-アクチンを用いた。図4、図5にそれぞれhWAR-1遺伝子とTRAM遺伝子の組織発現の結果を示す。hTRAMはあらゆる組織で発現しているのに対して(図5)、hWAR-1はリンパ系組織(脾臓、胸腺、白血球)、肺、肝臓などの組織では発現が認められなかった(図4)。先の実施例4の結果より、肺癌(A459)、Tリンパ腫(MOLT4、Jurkat)、肝癌(HepG2)の各細胞株ではhTRAM遺伝子が発現していたことから(図3)、これらの組織においては癌化に伴ってhTRAMが発現してくることが示された。

【0070】

実施例6

組換えコスミドベクターの作製

hWAR-1をコードするcDNA遺伝子(配列番号: 3)の開始コドンのATG配列の36塩基対上流のPvuII切断部位から終始コドンTAAから139塩基対下流のDraI切断部位までの約1.3KbのDNA断片を用いて、hWAR-1のセンス鎖、アンチセンス鎖が挿入されたコスミドベクターを作製した。具体的には、SwaIで切断したpAXCAwtコスミドベクター(Kanegae et al., 1995, Nucleic Acid Res., 23, 3

816-3821に記載、また Adenovirus Expression vector kitとして宝酒造より購入可能)に、前記hWAR-1 1.3Kb PvuII/DraI断片を連結後、挿入断片を含まないコスミドベクターをSwaIで消化し、反応液の一部を常法によりインビトロパッケージングした。大腸菌DH5αに感染後、出現したコロニーからコスミドDNAを回収し、EcoRI/XhoIで切断後、1%アガロースゲル電気泳動にて解析した。その結果、センス鎖RNAを発現するクローンが9種、アンチセンス鎖を発現するクローンが6種得られた。その

内各々3種を選別し、センス鎖のRNAを発現するものは、EcoRI/XbaIまたはBglIIによって、またアンチセンス鎖のRNAを発現するものは、StuI/XbaIまたはEcoRI/XhoIにより切断し、DNA断片の方向性の確認と挿入断片に異常のないことを確認した。

【0071】

実施例7

組換えアデノウイルスの作製

ヒトアデノウイルス5型由来非増殖型組換えアデノウイルスベクター (E1及びE3遺伝子を欠失)のE1遺伝子欠失部位に、実施例6で作製したhWAR-1遺伝子 (センス/アンチセンス) の発現単位を挿入した組換えアデノウイルスベクターを作製するために、以下の操作を行った。なお、プロモーターは高発現プロモーターとして特開平3-168087号公報に開示されているCAGプロモーターを用い、また組換えアデノウイルスの作製は既存の方法 (Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 93, 1320-1324 (1996)、及び特開平7-298877) に従った。

【0072】

アデノウイルスのE1遺伝子欠失部位にCAGプロモーターのみが挿入された組換えアデノウイルスベクター AxCAwt (Kanegae et al., 1995, Nucleic Acid Res., 23, 3816-3821に記載、また Adenovirus Expression vector kitとして宝酒造より購入可能) から、既存の方法 (特開平7-298877) に従いウイルスDNA-末端蛋白質複合体を調製し、制限酵素EcoT22I及びClaIで同時消化した。この制限酵

素消化ウイルスDNA-末端蛋白質複合体と、実施例6で作製したhWAR-1センス鎖、もしくはアンチセンス鎖を挿入したコスミドベクターとを用い、リン酸カルシウム共沈法で293細胞を形質転換した。生じた組換えアデノウイルスをクローニング後、ウイルスDNAをXhoI及びClaIで消化することにより目的ウイルスを選別し、組換えアデノウイルスベクターAxCAWAR1-L（センス鎖）とAxCAWAR1-R（アンチセンス鎖）を得た。この組換えウイルスを継代した4次ウイルス液の力価を既存の方法（特開平7-298877）

により測定し、以後の実験に用いた。

【0073】

実施例8

組換えアデノウイルスベクター感染によるhWAR-1遺伝子の発現

実施例7で作製したアデノウイルスベクターAxCAWAR1-LまたはAxCAWAR1-R、およびAxCAwt（コントロールウイルス）をヒトグリア芽細胞腫株T98Gに重複感染度10で37℃、1時間感染させ、その後5% FCS含有最小栄養培地で培養した。感染翌日に培地を低血清培地（0.5% FCS）に交換した。感染2日後において、いずれのアデノウイルスベクターを感染させた細胞においても、培地のみで感染操作を行った細胞と比べて変性しており、アデノウイルス感染の影響が若干認められたものの、センス鎖を発現するAxCAWAR1-Lを感染させた細胞にのみ顕著な形態変化が観察された（図6）。また、AxCAWAR1-R感染細胞の形態はAxCAwt感染細胞と差は認められなかった。さらに、AxCAWAR1-Lを感染させたT98G細胞は、感染3日後より細胞死を起こし始めた。

【0074】

実施例9

WAR-1センスRNA発現によるT98G細胞の形態変化

形態の変化を観察し易いように感染時の細胞密度を低くし（実施例8におけるコンフルエント状態の細胞の約1/10の細胞密度）、アデノウイルスベクターAxCAWAR1-L（センス鎖）またはAxCAWAR1-R（アンチセンス鎖）、およびAxCAwt（コントロール）を実施例8と同様にT98G細胞に

感染させ、細胞の形態変化を経時的に観察した。感染翌日にはコントロールであるAxCAt感染細胞においても、培地のみで感染操作を行った細胞と比べて変性し始めており、アデノウイルス感染による影響が若干認められた(図7)。しかし、AxCAt感染細胞と比べて、hWAR-1のセンス鎖を発現するAxCAWAR1-Lを感染させた細胞は、感染翌日(感染21~31時間後)には顕著な形態変化が観察され、感染3日後には細胞死を迎え始めた(図8)。なお、アンチセンスRNAを発現するAxCAWAR1-R感染細胞の形態は、AxCAt感染細胞と差は認められなかった(データは示さず)。

【0075】

実施例10

WAR-1タンパク質添加によるT98G細胞の形態変化

WAR-1タンパク質を、あらかじめリポソームに封入したり、リピッドを結合させることにより、細胞膜への透過性を増しておく。また、タンパクのC末端に小胞体保持配列であるLys-Asp-Glu-Leu(KDEL)を付加したりすることにより、細胞質に取り込まれたタンパク質を小胞体に輸送できるようにする。このような処理を施した本発明のタンパク質を、実施例8及び9で用いたT98Gの培養液中に添加後、数日間培養する。その後、T98Gの細胞数や細胞の形態変換を観察することにより、癌細胞増殖阻害活性を測定することができる。また、³Hで標識されたチミジンの取り込み能の低下を測定すること(Nagase et al., Int. J. Cancer, 65, 620-626, 1996)によっても、癌細胞の増殖阻害活性を測定することができる。

【0076】

【発明の効果】

本発明のDNAは、癌細胞増殖阻害効果を示すWAR-1をコードするものであり、該DNAにコードされるWAR-1ポリペプチドを細胞内で産生または産生誘導させることにより、癌細胞の増殖を阻害し、癌細胞に細胞死を起こさせることができる。本発明はこのようなWAR-1の効果に基く新しい癌治療方法を提供することができる。

【0077】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Pharmaceuticals Co.,Ltd.

<120> Novel protein WAR-1, and gene encoding the same

<130> 132537

<160> 10

【0078】

<210> 1

<211> 2311

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

agagagagag agagagagag agagagagag agagagagaa atttgatttc cacagcatca	60
gctccttaag ggaaggtgag attcctaaga gatcagtaga gagcaccagg gagctcgctg	120
ctgtgttgct atggtgatga tggcaatggt aatgacagtg gcaccagatt tccctgttcc	180
tgggaagccc ctccggctcc cgcgggtggg cggcggcggc gatcgggtgcg gcaaatccgc	240
gctcgcaccc gggcctgcgg ggcaggggcg cggcgctcga tticcttccc tgcctctgca	300
gccccgtgac gcatgctcgg cctacgcggc cccagccttt gattgatcgg tcggcagcgg	360
ctgcgaccct gggcggcaga cgggcgggga tggggagccc ggcgctggga gcggcgcagt	420
gatacgcggt ggcggccggt gataccggt gataccgcg gc atg ggg ctc cgc	474

Met Gly Leu Arg

aag aag aac gcc agg aac ccc ccg gtg ctg agc cac gaa ttc atg gtg	522
---	-----

Lys Lys Asn Ala Arg Asn Pro Pro Val Leu Ser His Glu Phe Met Val

5

10

15

20

cag aac cac gcg gat atg gtc tcc tgc gtg ggc atg ttc ttc gtg ctg	570
---	-----

Gln Asn His Ala Asp Met Val Ser Cys Val Gly Met Phe Phe Val Leu

25

30

35

gga ctt atg ttc gag ggc acg gcc gag atg tcg atc gtg ttc ctc acc	618
Gly Leu Met Phe Glu Gly Thr Ala Glu Met Ser Ile Val Phe Leu Thr	
40 45 50	
ctg cag cat gga gtc gtt gtc cca gcg gaa ggg cta ccc tcg ggg tcc	666
Leu Gln His Gly Val Val Val Pro Ala Glu Gly Leu Pro Ser Gly Ser	
55 60 65	
agg acc ctt tac cat tat ggg gtc aaa gat ctg gcc aca gtg ttc ttc	714
Arg Thr Leu Tyr His Tyr Gly Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Phe Phe	
70 75 80	
tac atg ctg gtg gcc atc atc att cac gcc acc att cag gag tac gtg	762
Tyr Met Leu Val Ala Ile Ile Ile His Ala Thr Ile Gln Glu Tyr Val	
85 90 95 100	
cta gat aag ctc agc cgg aga ctg cag ctc acc aaa ggc aaa caa aac	810
Leu Asp Lys Leu Ser Arg Arg Leu Gln Leu Thr Lys Gly Lys Gln Asn	
105 110 115	
aaa ttg aat gag gcc ggg cag ctg agt gtg ttc tac ata gtg tct ggt	858
Lys Leu Asn Glu Ala Gly Gln Leu Ser Val Phe Tyr Ile Val Ser Gly	
120 125 130	
atc tgg ggt atg atc att ctg gcc tct gag aac tgc ctg tca gac ccc	906
Ile Trp Gly Met Ile Ile Leu Ala Ser Glu Asn Cys Leu Ser Asp Pro	
135 140 145	
act cta ttg tgg aag tct cag ccc cac aac atg atg aca ttt cag atg	954
Thr Leu Leu Trp Lys Ser Gln Pro His Asn Met Met Thr Phe Gln Met	
150 155 160	
aaa ttt ttc tac atc tca cag ttg gct tac tgg ttt cat agt ttc ccg	1002
Lys Phe Phe Tyr Ile Ser Gln Leu Ala Tyr Trp Phe His Ser Phe Pro	
165 170 175 180	
gag ctc tac ttc cag aaa gtc agg aaa caa gat atc ccg ggt caa ctc	1050
Glu Leu Tyr Phe Gln Lys Val Arg Lys Gln Asp Ile Pro Gly Gln Leu	

185	190	195	
atc tac att ggc ctc cac ctc ttc cac att gga ggg gcc tat ctc ttg			1098
Ile Tyr Ile Gly Leu His Leu Phe His Ile Gly Gly Ala Tyr Leu Leu			
200	205	210	
tac ttg aac cac ctg ggc ctg ctg ctt ctg atg ctg cac tat gct gtc			1146
Tyr Leu Asn His Leu Gly Leu Leu Leu Leu Met Leu His Tyr Ala Val			
215	220	225	
<hr/>			
gag ctc ctc tcc agc gtg tgc agc ctg ctt tac ttt ggg gat gag cgg			1194
Glu Leu Leu Ser Ser Val Cys Ser Leu Leu Tyr Phe Gly Asp Glu Arg			
230	235	240	
tac cag aaa ggg ttg tct ttg tgg cct atc gtg ttt ata tcc ggg aga			1242
Tyr Gln Lys Gly Leu Ser Leu Trp Pro Ile Val Phe Ile Ser Gly Arg			
245	250	255	260
ctc gtg aca ctg att gtc tca gtg gtt aca gta ggg ctt cac ttg gcc			1290
Leu Val Thr Leu Ile Val Ser Val Val Thr Val Gly Leu His Leu Ala			
265	270	275	
ggg aca aat cgg aat gga aat gct ctc tct ggt aat gtc aat gtg ttg			1338
Gly Thr Asn Arg Asn Gly Asn Ala Leu Ser Gly Asn Val Asn Val Leu			
280	285	290	
gca gct aaa atc gct gtt ctg tcc tcg agt tgc agt atc cag gtg tac			1386
Ala Ala Lys Ile Ala Val Leu Ser Ser Ser Cys Ser Ile Gln Val Tyr			
295	300	305	
ata aca tgg acc ttg acg acc gtc tgg ctt cag aga tgg tta gaa gat			1434
Ile Thr Trp Thr Leu Thr Thr Val Trp Leu Gln Arg Trp Leu Glu Asp			
310	315	320	
gcg aat ctt cat gtc tgt ggg agg aag aga cgg tcc agg tcg aga aaa			1482
Ala Asn Leu His Val Cys Gly Arg Lys Arg Arg Ser Arg Ser Arg Lys			
325	330	335	340
ggc aca gaa aat gga gtg gag aat cca aat aga ata gat tct cca cca			1530

Gly Thr Glu Asn Gly Val Glu Asn Pro Asn Arg Ile Asp Ser Pro Pro

345

350

355

aag aag aaa gag aaa gct cct tagcagttgc aagcgaattg attcttacct 1581

Lys Lys Lys Glu Lys Ala Pro

360

ccaagggaat ccacttcttc ttatgtgggtg tctctgtgct agagattttc tgttcttcag 1641

aacgggtcgt gctttttgaa tattgctaata gtattgtcta atgtgttttt aaggttttgc 1701

agacgtatga gtgggggatg ggggttaaga ctaaaccact cagcctctaa atacagtcag 1761

aatagttaac ggaccaacat cttatttagt taggttctta cctcaacgat tttccaaacg 1821

ttttgtgggtg atgactgcag aattgtgtac ataaataata gtttcctgct tccaatgttc 1881

tttatcgaat taacaagtct gctagcaaag tggtttgttt tctcaatgtt ctccctgcagg 1941

ataaagtgga aaatctgata aagggttaaac tcaaatcagt attatgtaac cgttgggatt 2001

tttttaaagt gttttaaatt tacaatggaa agcatttgct aaaccaccaa aaatatgtgt 2061

ttaattttat gagtagtaat tgttagtgtc tacgccccca ttaaagcatc aaaatatgaa 2121

tagatgacat gtgtggtgat attgacattt agcgaatcaa gataccttta ataaatatgg 2181

tgggttacta aagaagtaaa cgacttcttc ctgtttattt taaacacttg tacaggaaaa 2241

ctcgcaaaat taaatattac tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2301

aaaaaaaaaa 2311

【0079】

<210> 2

<211> 363

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 2

Met Gly Leu Arg Lys Lys Asn Ala Arg Asn Pro Pro Val Leu Ser His

5

10

15

Glu Phe Met Val Gln Asn His Ala Asp Met Val Ser Cys Val Gly Met

20

25

30

Phe Phe Val Leu Gly Leu Met Phe Glu Gly Thr Ala Glu Met Ser Ile

35	40	45
Val Phe Leu Thr Leu Gln His Gly Val Val Val Pro Ala Glu Gly Leu		
50	55	60
Pro Ser Gly Ser Arg Thr Leu Tyr His Tyr Gly Val Lys Asp Leu Ala		
65	70	75
Thr Val Phe Phe Tyr Met Leu Val Ala Ile Ile Ile His Ala Thr Ile		
85	90	95
<hr/>		
Gln Glu Tyr Val Leu Asp Lys Leu Ser Arg Arg Leu Gln Leu Thr Lys		
100	105	110
Gly Lys Gln Asn Lys Leu Asn Glu Ala Gly Gln Leu Ser Val Phe Tyr		
115	120	125
Ile Val Ser Gly Ile Trp Gly Met Ile Ile Leu Ala Ser Glu Asn Cys		
130	135	140
Leu Ser Asp Pro Thr Leu Leu Trp Lys Ser Gln Pro His Asn Met Met		
145	150	155
Thr Phe Gln Met Lys Phe Phe Tyr Ile Ser Gln Leu Ala Tyr Trp Phe		
165	170	175
His Ser Phe Pro Glu Leu Tyr Phe Gln Lys Val Arg Lys Gln Asp Ile		
180	185	190
Pro Gly Gln Leu Ile Tyr Ile Gly Leu His Leu Phe His Ile Gly Gly		
195	200	205
<hr/>		
Ala Tyr Leu Leu Tyr Leu Asn His Leu Gly Leu Leu Leu Met Leu		
210	215	220
His Tyr Ala Val Glu Leu Leu Ser Ser Val Cys Ser Leu Leu Tyr Phe		
225	230	235
Gly Asp Glu Arg Tyr Gln Lys Gly Leu Ser Leu Trp Pro Ile Val Phe		
245	250	255
Ile Ser Gly Arg Leu Val Thr Leu Ile Val Ser Val Val Thr Val Gly		
260	265	270

Leu His Leu Ala Gly Thr Asn Arg Asn Gly Asn Ala Leu Ser Gly Asn

275

280

285

Val Asn Val Leu Ala Ala Lys Ile Ala Val Leu Ser Ser Ser Cys Ser

290

295

300

Ile Gln Val Tyr Ile Thr Trp Thr Leu Thr Thr Val Trp Leu Gln Arg

305

310

315

320

Trp Leu Glu Asp Ala Asn Leu His Val Cys Gly Arg Lys Arg Arg Ser

325

330

335

Arg Ser Arg Lys Gly Thr Glu Asn Gly Val Glu Asn Pro Asn Arg Ile

340

345

350

Asp Ser Pro Pro Lys Lys Lys Glu Lys Ala Pro

355

360

[0 0 8 0]

<210> 3

<211> 2288

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

tatagggcac gcgtggtcga cggcccgggc tggactggg attttgctgt tattattatg 60

ctattgttgt tataattaat gatctgaaga ataaccagag ctctataggt ttatcatgat 120

tactaatgaa gatgccacta aaaaaaagaa ttcaggagca tcttggcggg ggcagcgagt 180

ttgaagatgc gacgatcaac gtigaagatc accgctcgca accccgggcc tggcgccggg 240

taggggcgcg gcgctcgatt tccttcctg cctccgccgt cccctgggtg cgcatgctca 300

gctcagctcg gccctgcct ttgatttatt ttttttctgg gcggccgctg cgacccggga 360

ctgacttcgg gatgggaagt ggagccccg gagctgctac cgtggcggcg gcgctgtgag 420

gagcagccag ggggaggcag ctgcggctcg ccggtgagta tccggaagc gccacc 476

atg ggg ctc cgt aag aag agc acc aag aac ccc ccc gtt ctc agc cag 524

Met Gly Leu Arg Lys Lys Ser Thr Lys Asn Pro Pro Val Leu Ser Gln

5

10

15

gaa ttc atc ctg cag aat cat gcg gac atc gtc tcc tgc gtg ggg atg	572
Glu Phe Ile Leu Gln Asn His Ala Asp Ile Val Ser Cys Val Gly Met	
20 25 30	
ttc ttc ctg ctg ggg ctt gtg ttc gag gga aca gca gaa gca tcc atc	620
Phe Phe Leu Leu Gly Leu Val Phe Glu Gly Thr Ala Glu Ala Ser Ile	
35 40 45	
gtg ttt ctc act ctt cag cac agt gtt gct gtc cct gca gca gag gaa	668
Val Phe Leu Thr Leu Gln His Ser Val Ala Val Pro Ala Ala Glu Glu	
50 55 60	
caa gcc acg ggc tca aag tcc ctc tat tat tat ggt gtc aaa gat ttg	716
Gln Ala Thr Gly Ser Lys Ser Leu Tyr Tyr Tyr Gly Val Lys Asp Leu	
65 70 75 80	
gcc acg gtt ttc ttc tac atg ctg gtg gca atc att att cat gcc aca	764
Ala Thr Val Phe Phe Tyr Met Leu Val Ala Ile Ile Ile His Ala Thr	
85 90 95	
att cag gaa tat gtg ttg gat aaa att aac aag aga atg cag ttc acc	812
Ile Gln Glu Tyr Val Leu Asp Lys Ile Asn Lys Arg Met Gln Phe Thr	
100 105 110	
aaa gcg aaa caa aac aag ttt aac gag tct ggt cag ttt agt gtg ttc	860
Lys Ala Lys Gln Asn Lys Phe Asn Glu Ser Gly Gln Phe Ser Val Phe	
115 120 125	
tac ttt ttt tct tgt att tgg ggc aca ttc att tta atc tct gaa aac	908
Tyr Phe Phe Ser Cys Ile Trp Gly Thr Phe Ile Leu Ile Ser Glu Asn	
130 135 140	
tgc ctg tca gac cca act ctt ata tgg aag gct cgt ccc cat agc atg	956
Cys Leu Ser Asp Pro Thr Leu Ile Trp Lys Ala Arg Pro His Ser Met	
145 150 155 160	
atg aca ttt caa atg aag ttt ttc tac ata tcc cag ttg gct tac tgg	1004
Met Thr Phe Gln Met Lys Phe Phe Tyr Ile Ser Gln Leu Ala Tyr Trp	

165	170	175	
ttt cat gct ttt cct gaa ctc tac ttc cag aaa acc aaa aaa caa gac			1052
Phe His Ala Phe Pro Glu Leu Tyr Phe Gln Lys Thr Lys Lys Gln Asp			
180	185	190	
atc cct cgt caa ctt gtc tac att ggt ctt cac ctc ttc cac att act			1100
Ile Pro Arg Gln Leu Val Tyr Ile Gly Leu His Leu Phe His Ile Thr			
195	200	205	
<hr/>			
gga gct tat ctc ttg tac ttg aat cat ttg gga ctt ctt ctt ttg gta			1148
Gly Ala Tyr Leu Leu Tyr Leu Asn His Leu Gly Leu Leu Leu Leu Val			
210	215	220	
ctg cat tat ttt gtt gaa tta ctt tcc cac atg tgc ggc ctg ttt tac			1196
Leu His Tyr Phe Val Glu Leu Leu Ser His Met Cys Gly Leu Phe Tyr			
225	230	235	240
ttt agt gat gaa aag tac cag aaa ggc ata tct ctg tgg gcc att gtg			1244
Phe Ser Asp Glu Lys Tyr Gln Lys Gly Ile Ser Leu Trp Ala Ile Val			
245	250	255	
ttt atc ttg ggt aga ctt gtg act tta att gtt tcc gta ctc act gtt			1292
Phe Ile Leu Gly Arg Leu Val Thr Leu Ile Val Ser Val Leu Thr Val			
260	265	270	
ggg ttt cac ctg gct gga tcg cag aat cgg aat cct gat gcc ctt act			1340
Gly Phe His Leu Ala Gly Ser Gln Asn Arg Asn Pro Asp Ala Leu Thr			
<hr/>			
275	280	285	
gga aat gta aat gtg ttg gca gct aaa att gct gtt ctg tcg tcc agt			1388
Gly Asn Val Asn Val Leu Ala Ala Lys Ile Ala Val Leu Ser Ser Ser			
290	295	300	
tgc acg atc caa gcc tac gta aca tgg aac tta att act ctc tgg ctt			1436
Cys Thr Ile Gln Ala Tyr Val Thr Trp Asn Leu Ile Thr Leu Trp Leu			
305	310	315	320
cag agg tgg gta gaa gat tct aat att cag gcc tca tgt atg aaa aag			1484

Gln Arg Trp Val Glu Asp Ser Asn Ile Gln Ala Ser Cys Met Lys Lys			
325	330	335	
aaa cgg tcg aga tct tct aaa aaa aga aca gaa aac gga gtg gga gtg	1532		
Lys Arg Ser Arg Ser Ser Lys Lys Arg Thr Glu Asn Gly Val Gly Val			
340	345	350	
gaa act tca aat aga gta gac tgt ccg cca aag agg aaa gag aaa tct	1580		
Glu Thr Ser Asn Arg Val Asp Cys Pro Pro Lys Arg Lys Glu Lys Ser			
355	360	365	
tca taatctttgc aagcgcattg attaatgtct gcaaaggaat ctgctctttg	1633		
Ser			
aggtttcttt ctgcactaga gatttttctg tttttgaaaa tagttcgtgc tcttcggttt	1693		
ttgttattga actgtttcat gtatttttta aagacatttg aggggaggag gattattatg	1753		
aatgggaaaa aaagattttg gttgagacta aattactcat cgtcaaaata atgtcaaaat	1813		
agttttgggg atcaccacta tttttgttt tgatttttaa cctttcaaca ttttccta	1873		
gatttgcaga gataactgca caattttgca tatcaatgat actggttctt actcccacca	1933		
gtgtttcata atactaaca gatggtctct cctagcaaga ttatgtgttt aatgcttgct	1993		
ttggggtaaa ataaaagtac gaaaaagggt gaagtcaaat cagtattctg taattgtag	2053		
aatttatattt ttaagaactt acaactcaga aaagattgct agactcacca aaataataaa	2113		
tgttctttat ttacaggta gtgattatta gtgcttcac cccatttaaa aaaacacagt	2173		
actaatgggt aacacatatg gaggtttgct gccatatata ttgcatcaaa atatcattaa	2233		
ttaatataaa aatatataaa tcattcctgt ccattccact tgtaaattggg aattc	2288		

【 0 0 8 1 】

<210> 4

<211> 369

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Leu Arg Lys Lys Ser Thr Lys Asn Pro Pro Val Leu Ser Gln

	5	10	15
Glu Phe Ile Leu Gln Asn His Ala Asp Ile Val Ser Cys Val Gly Met			
	20	25	30
Phe Phe Leu Leu Gly Leu Val Phe Glu Gly Thr Ala Glu Ala Ser Ile			
	35	40	45
Val Phe Leu Thr Leu Gln His Ser Val Ala Val Pro Ala Ala Glu Glu			
	50	55	60

Gln Ala Thr Gly Ser Lys Ser Leu Tyr Tyr Tyr Gly Val Lys Asp Leu			
	65	70	75
Ala Thr Val Phe Phe Tyr Met Leu Val Ala Ile Ile Ile His Ala Thr			
	85	90	95
Ile Gln Glu Tyr Val Leu Asp Lys Ile Asn Lys Arg Met Gln Phe Thr			
	100	105	110
Lys Ala Lys Gln Asn Lys Phe Asn Glu Ser Gly Gln Phe Ser Val Phe			
	115	120	125
Tyr Phe Phe Ser Cys Ile Trp Gly Thr Phe Ile Leu Ile Ser Glu Asn			
	130	135	140
Cys Leu Ser Asp Pro Thr Leu Ile Trp Lys Ala Arg Pro His Ser Met			
	145	150	155
Met Thr Phe Gln Met Lys Phe Phe Tyr Ile Ser Gln Leu Ala Tyr Trp			
	165	170	175

Phe His Ala Phe Pro Glu Leu Tyr Phe Gln Lys Thr Lys Lys Gln Asp			
	180	185	190
Ile Pro Arg Gln Leu Val Tyr Ile Gly Leu His Leu Phe His Ile Thr			
	195	200	205
Gly Ala Tyr Leu Leu Tyr Leu Asn His Leu Gly Leu Leu Leu Val			
	210	215	220
Leu His Tyr Phe Val Glu Leu Leu Ser His Met Cys Gly Leu Phe Tyr			
	225	230	235
			240

Phe Ser Asp Glu Lys Tyr Gln Lys Gly Ile Ser Leu Trp Ala Ile Val
245 250 255

Phe Ile Leu Gly Arg Leu Val Thr Leu Ile Val Ser Val Leu Thr Val
260 265 270

Gly Phe His Leu Ala Gly Ser Gln Asn Arg Asn Pro Asp Ala Leu Thr
275 280 285

Gly Asn Val Asn Val Leu Ala Ala Lys Ile Ala Val Leu Ser Ser Ser
290 295 300

Cys Thr Ile Gln Ala Tyr Val Thr Trp Asn Leu Ile Thr Leu Trp Leu
305 310 315 320

Gln Arg Trp Val Glu Asp Ser Asn Ile Gln Ala Ser Cys Met Lys Lys
325 330 335

Lys Arg Ser Arg Ser Ser Lys Lys Arg Thr Glu Asn Gly Val Gly Val
340 345 350

Glu Thr Ser Asn Arg Val Asp Cys Pro Pro Lys Arg Lys Glu Lys Ser
355 360 365

Ser

【 0 0 8 2 】

<210> 5

<211> 1267

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

cagcagcgg ctgcagcggg gccgtgacca gcagccagcg ggaggcggcg gcgagtcggt 60

gagcagctgg gaagagcaga accggggcgg agcacctgca ggcgcgggcg gcggccccac 120

c atg gcg att cgc aag aaa agc acc aag agc ccc cca gtg ctg agc 166

Met Ala Ile Arg Lys Lys Ser Thr Lys Ser Pro Pro Val Leu Ser

5

10

15

cac gaa ttc gtc ctg cag aat cac gcg gac atc gtc tcc tgt gtg gcg 214

His Glu Phe Val Leu Gln Asn His Ala Asp Ile Val Ser Cys Val Ala

20

25

30

atg gtc ttc ctg ctg ggg ctc atg ttt gag ata acg gca aaa gct tct 262

Met Val Phe Leu Leu Gly Leu Met Phe Glu Ile Thr Ala Lys Ala Ser

35

40

45

atc att ttt gtt act ctt cag tac aat gtc acc ctc cca gca aca gaa 310

Ile Ile Phe Val Thr Leu Gln Tyr Asn Val Thr Leu Pro Ala Thr Glu

50

55

60

gaa caa gct act gaa tca gtg tcc ctt tat tac tat ggc atc aaa gat 358

Glu Gln Ala Thr Glu Ser Val Ser Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ile Lys Asp

65

70

75

ttg gct act gtt ttc ttc tac atg cta gtg gcg ata att att cat gcc 406

Leu Ala Thr Val Phe Phe Tyr Met Leu Val Ala Ile Ile Ile His Ala

80

85

90

95

gta att caa gag tat atg ttg gat aaa att aac agg cga atg cac ttc 454

Val Ile Gln Glu Tyr Met Leu Asp Lys Ile Asn Arg Arg Met His Phe

100

105

110

tcc aaa aca aaa cac agc aag ttt aat gaa tct ggt cag ctt agt gcg 502

Ser Lys Thr Lys His Ser Lys Phe Asn Glu Ser Gly Gln Leu Ser Ala

115

120

125

ttc tac ctt ttt gcc tgt gtt tgg ggc aca ttc att ctc atc tct gaa 550

Phe Tyr Leu Phe Ala Cys Val Trp Gly Thr Phe Ile Leu Ile Ser Glu

130

135

140

aac tac atc tca gac cca act atc tta tgg agg gct tat ccc cat aac 598

Asn Tyr Ile Ser Asp Pro Thr Ile Leu Trp Arg Ala Tyr Pro His Asn

145

150

155

ctg atg aca ttt caa atg aag ttt ttc tac ata tca cag ctg gct tac 646

Leu Met Thr Phe Gln Met Lys Phe Phe Tyr Ile Ser Gln Leu Ala Tyr

160	165	170	175		
tg	ctt	cat	gct	ttt cct gaa ctc tac ttc cag aaa acc aaa aaa gaa	694
Trp	Leu	His	Ala	Phe Pro Glu Leu Tyr Phe Gln Lys Thr Lys Lys Glu	
	180	185	190		
gat	att	cct	cgt	cag ctt gtc tac att ggt ctt tac ctc ttc cac att	742
Asp	Ile	Pro	Arg	Gln Leu Val Tyr Ile Gly Leu Tyr Leu Phe His Ile	
	195	200	205		
<hr/>					
gct	gga	gct	tac	ctt ttg aac ttg aat cat cta gga ctt gtt ctt ctg	790
Ala	Gly	Ala	Tyr	Leu Leu Asn Leu Asn His Leu Gly Leu Val Leu Leu	
	210	215	220		
gtg	cta	cat	tat	ttt gtt gaa ttt ctt ttc cac att tcc cgc ctg ttt	838
Val	Leu	His	Tyr	Phe Val Glu Phe Leu Phe His Ile Ser Arg Leu Phe	
	225	230	235		
tat	ttt	agc	aat	gaa aag tat cag aaa gga ttt tct ctg tgg gca gtt	886
Tyr	Phe	Ser	Asn	Glu Lys Tyr Gln Lys Gly Phe Ser Leu Trp Ala Val	
240	245	250	255		
ctt	ttt	gtt	ttg	gga aga ctt ctg act tta att ctt tca gta ctg act	934
Leu	Phe	Val	Leu	Gly Arg Leu Leu Thr Leu Ile Leu Ser Val Leu Thr	
	260	265	270		
gtt	ggt	ttt	ggc	ctt gca aga gca gaa aat cag aaa ctg gat ttc agt	982
Val	Gly	Phe	Gly	Leu Ala Arg Ala Glu Asn Gln Lys Leu Asp Phe Ser	
	275	280	285		
act	gga	aac	ttc	aat gtg tta gct gtt aga atc gct gtt ctg gca tcc	1030
Thr	Gly	Asn	Phe	Asn Val Leu Ala Val Arg Ile Ala Val Leu Ala Ser	
	290	295	300		
att	tgc	gtt	act	cag gca ttt atg atg tgg aag ttc att aat ttt cag	1078
Ile	Cys	Val	Thr	Gln Ala Phe Met Met Trp Lys Phe Ile Asn Phe Gln	
	305	310	315		
ctt	cga	agg	tgg	agg gaa cat tct gct ttt cag gca cca gct gtg aag	1126

Ile Gln Glu Tyr Met Leu Asp Lys Ile Asn Arg Arg Met His Phe Ser
100 105 110

Lys Thr Lys His Ser Lys Phe Asn Glu Ser Gly Gln Leu Ser Ala Phe
115 120 125

Tyr Leu Phe Ala Cys Val Trp Gly Thr Phe Ile Leu Ile Ser Glu Asn
130 135 140

Tyr Ile Ser Asp Pro Thr Ile Leu Trp Arg Ala Tyr Pro His Asn Leu
145 150 155 160

Met Thr Phe Gln Met Lys Phe Phe Tyr Ile Ser Gln Leu Ala Tyr Trp
165 170 175

Leu His Ala Phe Pro Glu Leu Tyr Phe Gln Lys Thr Lys Lys Glu Asp
180 185 190

Ile Pro Arg Gln Leu Val Tyr Ile Gly Leu Tyr Leu Phe His Ile Ala
195 200 205

Gly Ala Tyr Leu Leu Asn Leu Asn His Leu Gly Leu Val Leu Leu Val
210 215 220

Leu His Tyr Phe Val Glu Phe Leu Phe His Ile Ser Arg Leu Phe Tyr
225 230 235 240

Phe Ser Asn Glu Lys Tyr Gln Lys Gly Phe Ser Leu Trp Ala Val Leu
245 250 255

Phe Val Leu Gly Arg Leu Leu Thr Leu Ile Leu Ser Val Leu Thr Val
260 265 270

Gly Phe Gly Leu Ala Arg Ala Glu Asn Gln Lys Leu Asp Phe Ser Thr
275 280 285

Gly Asn Phe Asn Val Leu Ala Val Arg Ile Ala Val Leu Ala Ser Ile
290 295 300

Cys Val Thr Gln Ala Phe Met Met Trp Lys Phe Ile Asn Phe Gln Leu
305 310 315 320

Arg Arg Trp Arg Glu His Ser Ala Phe Gln Ala Pro Ala Val Lys Lys

	325	330	335
Lys Pro Thr Val Thr Lys Gly Arg Ser Ser Lys Lys Gly Thr Glu Asn			
340	345	350	
Gly Val Asn Gly Thr Leu Thr Ser Asn Val Ala Asp Ser Pro Arg Asn			
355	360	365	
Lys Lys Glu Lys Ser Ser			
370			

【0084】

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cacctggctg gatcgagaa tcgg

24

【0085】

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ctctttcctc ttggcgagac agtc

24

【0086】

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

ggccttgcaa gagcagaaaa tcag

24

【0087】

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

tttattccgg ggagagtctg ctac

24

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、ヒト由来 TRAM（図中：h TRAM）、ヒト由来 WAR-1（図中：h WAR-1）及びラット由来 WAR-1（図中：r WAR-1）をコードする cDNA の塩基配列の相同性の解析結果を示す図である。

【図 2】

図 2 は、ヒト由来 TRAM（図中：h TRAM）、ヒト由来 WAR-1（図中：h WAR-1）及びラット由来 WAR-1（図中：r WAR-1）をコードする cDNA の塩基配列から推定される アミノ酸配列の相同性の解析結果を示す図である。

【図 3】

図 3 は、ヒト由来の各種癌細胞株における h WAR-1 遺伝子の発現を RT-PCR 法によって解析した結果を示す電気泳動写真の模写図である。上のレーンは h WAR-1 の RT-PCR の結果を、下のレーンは h TRAM の RT-PCR の結果を、それぞれ示す。

【図 4】

図 4 は、ヒト各種組織における h WAR-1 遺伝子の発現をノーザンハイブリダイゼーションによって解析した結果を示す電気泳動写真の模写図である。各写真の右に記載した数字は、RNA 分子量マーカーのサイズ（K b）を示している。

【図 5】

図 5 は、ヒト各種組織における h TRAM 遺伝子の発現をノーザンハイブリダ

イゼーションによって解析した結果を示す電気泳動写真の模写図である。各写真の右に記載した数字は、RNA分子量マーカーのサイズ(Kb)を示している。

【図6】

図6は、ヒトグリア芽細胞腫T98Gに、hWAR-1遺伝子を挿入したアデノウイルスを感染させ、形態変化を観察した結果を示す顕微鏡写真の模写図である。A：アデノウイルス非感染細胞、B：アデノウイルスベクターのみのアデノウイルス感染細胞、C：hWAR-1のセンス鎖を発現する組換えアデノウイルス感染細胞、D：hWAR-1のアンチセンス鎖を発現する組換えアデノウイルス感染細胞。

【図7】

図7は、アデノウイルスベクターAxCawtを感染させたT98G細胞の経時的な形態変化を示す顕微鏡写真の模写図である。A：感染直後、B：感染8時間後、C：感染21時間後（約1日後）、D：感染31時間後（約1.5日後）、E：感染46時間後（約2日後）、F：感染70時間後（約3日後）。

【図8】

図8は、hWAR-1のセンス鎖を発現する組換えアデノウイルスAxCAR1-Lを感染させたT98G細胞の経時的な形態変化を示す顕微鏡写真の模写図である。A：感染直後、B：感染8時間後、C：感染21時間後（約1日後）、D：感染31時間後（約1.5日後）、E：感染46時間後（約2日後）、F：感染70時間後（約3日後）。

【書類名】 図面

【图 1】

[illegible]

【图 2】

1 MAIRRHETTS SPPVLSHEEFV LQNHADISGVAV FLLQMF hTRAM.aa
1 MGLFHHKFNPPVLS QEEI LQNHADISGVVHFFLLQGV hWAR1.aa
1 MGLFHH NAR HPPVLSHEEF MV LQNHAD M SSVNHFV LQGV hWAR1.aa

41 EITAKA IIVTQYNT LPA TREQATE V VLYVYV IED hTRAM.aa
41 ESTAE A I F I T I H S A PA A R E I A T V K A L V Y V A I D L hWAR1.aa
41 ESTAE M I F I T I L O G V T P A - E G L P S L E R T L H V G D E L rWAR1.aa

81 ATUFFYHVAIINHAV V I R Y M L T F I N E R H F S E T H S F E hTRAM.aa
81 ATUFFYHVAIINHAT I R Y L D I N K E L E T H A R O D E F hWAR1.aa
80 ATUFFYHVAIINHAT I R Y L D I N L S F E L L T H G P O D L rWAR1.aa

121 ECHIS A F V L A V I S T F I L I R N Y I D E T I L R A Y P H L hTRAM.aa
121 ECHIS E F V L A V I S T F I L I R N Y I D E T I L R A Y P H L hWAR1.aa
120 ECHIS I V G I V M I A A H L D R P T L L I E S Q P H N rWAR1.aa

161 HTF M R R F V I L A Y V L H A P P H I V E L T E E T P P F I V Y hTRAM.aa
161 HTF M R R F V I L A Y V H A P P H I V E L T E E T P P F I V Y hWAR1.aa
160 HTF M R R F V I L A Y V H S P P P V P L E V R L D I G I I rWAR1.aa

201 TLYLFH A I A V L L N H D L V V I N T E R F I F M I S R L E F hTRAM.aa
201 TLYLFH T I A V L L V H D L L D L L H V P E L L M M G I F hWAR1.aa
200 TLYLFH G I A V L L V H D L L D L L H V P E L L M M A V E L L S V S L E rWAR1.aa


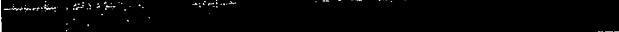
241 FGNERY I F I I A V L F V I L L L L D L T V I F G L A R A E hTRAM.aa
241 FGNERY I I I L A V L F V I L L L L D L T V I F G L A R A E hWAR1.aa
240 FGNERY I L I L P V F I S P E L L I I V I V L E A S T - rWAR1.aa

281 Q K L D F S I F F U D L A V R I A I V T L A F M M K F I N F O hTRAM.aa
281 H E P P A L T I I D A A A I A V L R I T I A V T N I T L hWAR1.aa
279 H E G N A L S I I I D A A A I A V L R I S I V V I T T L T V hWAR1.aa

321 R R R R E H S A F I P A V R R R P T V T K G R A S S E G T E N A V N G T L T hTRAM.aa
321 R R R R E H S A F I P A V R R R P T V T K G R A S S E G T E N A V N G T L T hWAR1.aa
319 R R R L E A L H V - G R R R - - - R R R R - - - R K G T E N - G E N P rWAR1.aa

361 H V A D S R N N F S S hTRAM.aa
356 H V C P R R R hWAR1.aa
350 H I P A P P P P P A P rWAR1.aa

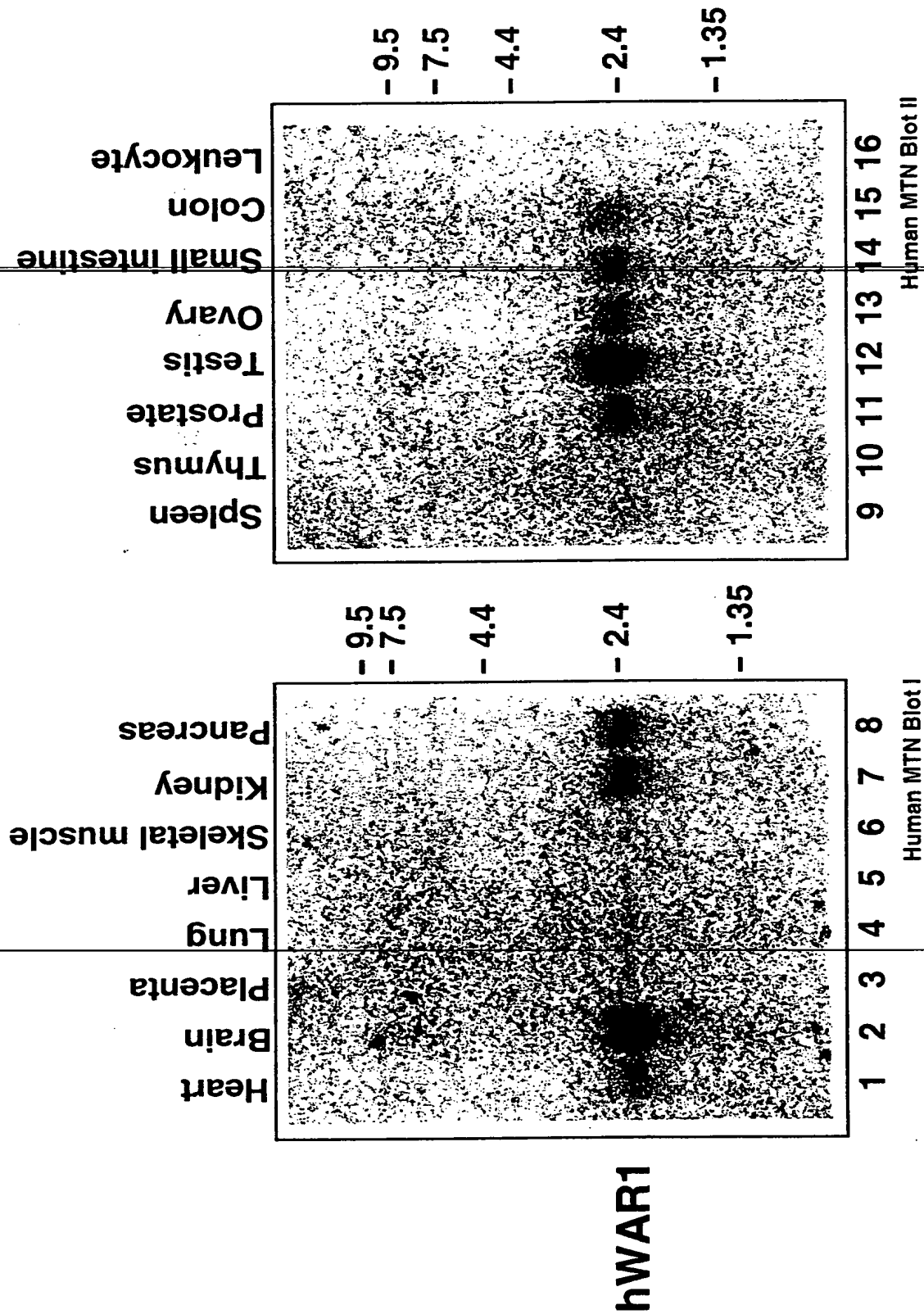
【图 3】

T24	HeLa	Jurkat	MOLT4	Daudi	A549	T98G	HepG2	G401	SW480
									
									

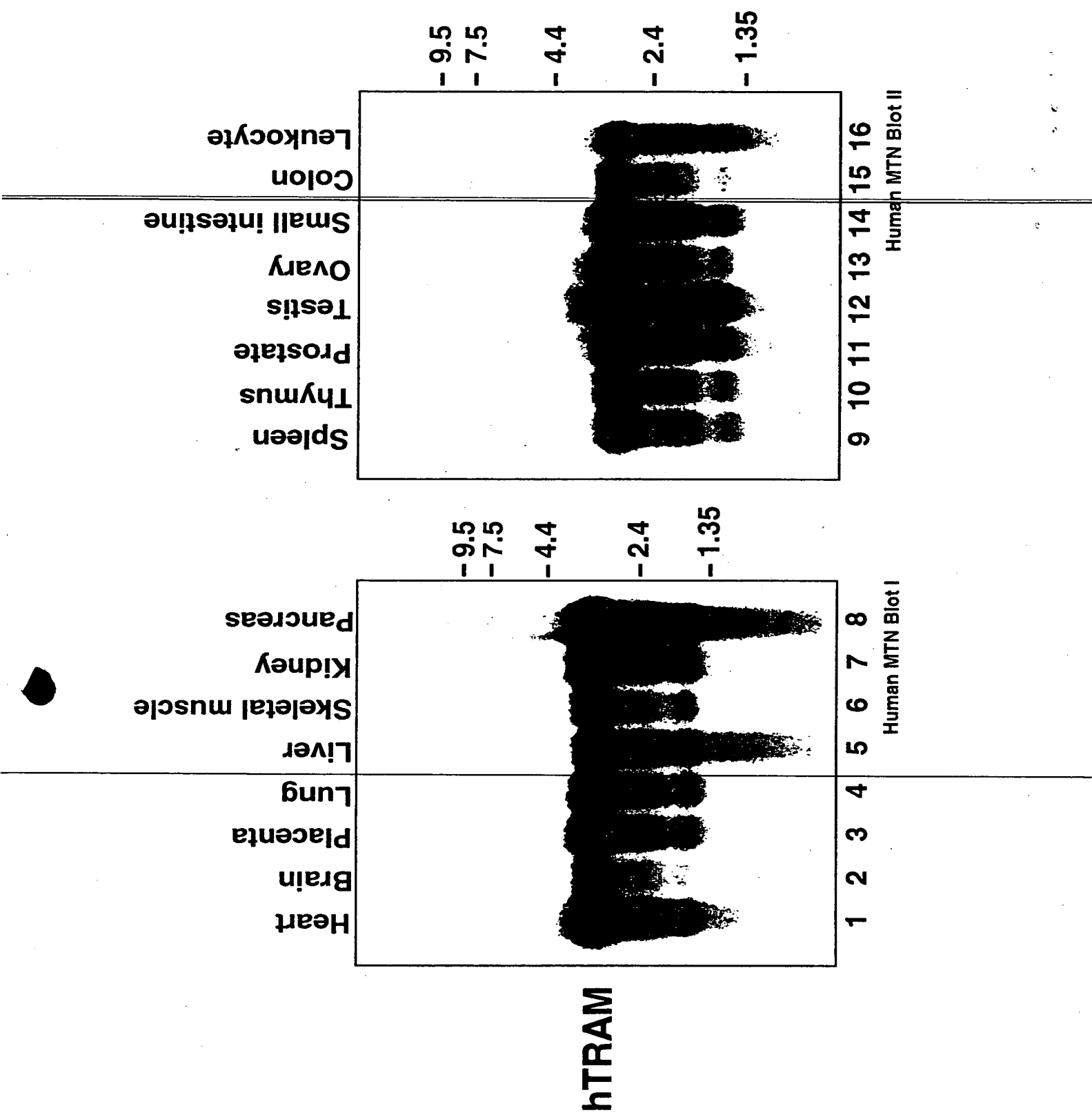
WAR-1

TRAM

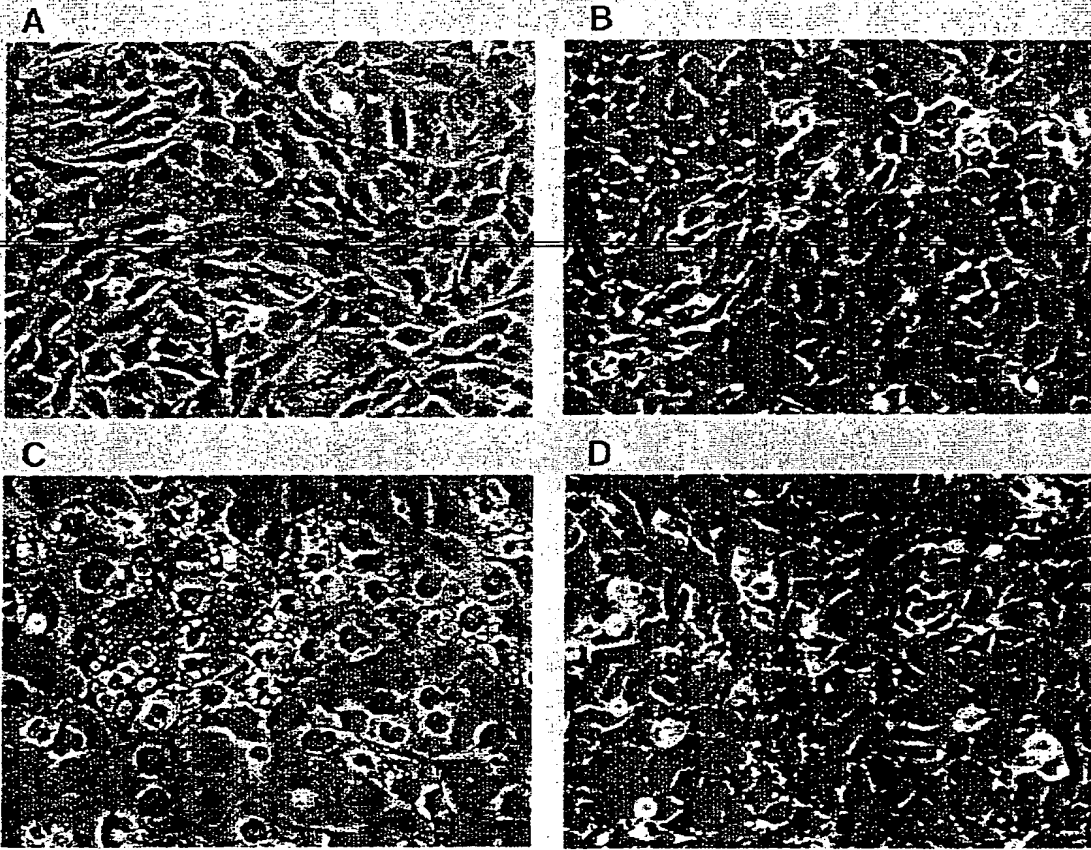
【図 4】



【図5】



【図6】



【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成10年10月13日

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100107629

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住
友製薬株式会社 法務部内

【氏名又は名称】 中村 敏夫